

Aus der Nuklearmedizinischen Abteilung der Inneren
Universitätskliniken im Städtischen Krankenhaus Westend
Leiter: Professor Dr. med. Karl Oeff

DER EINFLUSS VON CYCLOPHOSPHAMID ("ENDOXAN") AUF DEN
GENERATIONSCYCLUS VON EHRLICH-ASCITES-TUMORZELLEN

Eine autoradiographische
Untersuchung mit H^3 -Thymidin

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1960

vorgelegt von

Friedrich Wiebel

aus Marburg a.d. Lahn

Aus der Nuklearmedizinischen Abteilung der Inneren
Universitätskliniken im Städtischen Krankenhaus Westend

Leiter: Professor Dr. med. Karl O e f f

Der Einfluß von Cyclophosphamid ("Endoxan") auf den Gene-
rationscyclus von EHRLICH-Ascites-Tumorzellen.

Eine autoradiographische
Untersuchung mit H^3 -Thymidin.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wiebel, Friedrich
aus
Marburg a.d. Lahn

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier

Referent: Professor Dr. med. Karl Oeff

Korreferent: Professor Dr. med. Heinz Oeser

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4. März 1968



Inhaltsverzeichnis

=====

Seite

I. EINLEITUNG	
1. Zur Wirkung alkylierender Substanzen	1
2. Zur Histoautoradiographie	2
3. Zum Generationscyclus der Zelle	4
4. Zur Aufgabenstellung	8
II. MATERIAL und METHODE	
A. Material	10
B. Autoradiographische Methode	
1. Herstellung der Autoradiogramme	10
2. Auswertung der Autoradiogramme	10
C. Versuchsanordnung	12
III. ERGEBNISSE	13
IV. DISKUSSION	21
V. ZUSAMMENFASSUNG	28
VI. LITERATUR	30

- - - - -



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. E i n l e i t u n g

=====

1.) Zur Wirkung alkylierender Substanzen:

Cyclophosphamid gehört der Gruppe der sogenannten alkylierenden Substanzen an. Diese haben sich bei der Chemotherapie maligner Neoplasien im Experiment und in der Klinik z.T. als sehr wirksam erwiesen. Cyclophosphamid bewährte sich insbesondere bei der Therapie von Lymphogranulomatosen, Retothelsarkomen, Plasmocytomen und chronischen Leukämien (GERHARTZ 1964). Ihre Wirkung wird durch die Alkylierung lebenswichtiger Zellbausteine erklärt, die zu deren Funktionsverlust und zur anhaltenden Schädigung der Zelle führt (PÜTTER 1966). Es blieb aber bis jetzt trotz intensiver vielseitiger Suche umstritten, welche der physiologischen Substanzen durch den Eingriff der alkylierenden Verbindungen getroffen, bzw. welche biochemischen Reaktionen gehemmt oder fehlgesteuert werden.

Entsprechend der Vielfalt möglicher Reaktionsstellen (ROSS 1958) fand sich ein Einfluß auf zahlreiche Stoffwechselprozesse der Zelle, so unter anderem auf den Energiestoffwechsel, auf die Protein- und Nukleinsäuresynthese (Übersicht bei WHEELER 1962, PÜTTER 1966).

Während einige Untersucher (Übersicht bei HOLZER 1961) die tumorhemmende Wirkung der alkylierenden Substanzen auf einen Eingriff in die Glycolyse der Tumorzellen zurückführen, wurde von anderen die Einwirkung auf die Desoxyribonucleinsäure, sei es durch eine direkte Alkylierung (BROOKES a. LAWLEY 1960, RUTMAN u. Mitarb. 1961), sei es durch die Störung der De-novo-DNS-Synthese (BODENSTEIN u. KONDRITZER 1948, SMELLIE u. Mitarb. 1958) hervorgehoben. Eine neuere, gleichzeitige Bestimmung von Glycolyserate, DPN-Gehalt, DNS-Syntheserate und anderer Stoffwechselgrößen unter Einwirkung verschiedener alkylierender Cytostatica ergab, daß die De-novo-DNS-Synthese empfindlicher auf diese Substanzen reagiert, als die übrigen genannten Stoffwechselparameter (LISS u. PALME 1964). Es zeigte sich allerdings, daß eine Hemmung der Teilungs- und Wachstums-

tumsaktivität behandelter Zellen bei Dosen auftrat, die nur eine geringe Herabsetzung der DNS-Syntheserate bewirkten (LISS u. Mitarb. 1965).

Die Hemmung der Zellteilung nach Einwirkung alkylierender Substanzen wurde schon früh von FRIEDENWALD u. Mitarb. (1947) beschrieben und von ihm als der erste erkennbare Effekt in der Reaktion der betroffenen Gewebe bezeichnet. In zahlreichen Untersuchungen wurde später der ausgeprägte antimitotische Effekt der alkylierenden Substanzen sowohl auf Normalgewebe (KINDRED 1949; LANDING u. Mitarb. 1949) wie auf Tumorzellen (SATO u. Mitarb. 1956; KELLNER 1957) nachgewiesen.

Die Hemmung der Mitose war zwar häufig ein empfindliches Kriterium für die Wirkung einer exogenen Schädigung vor dem Befund morphologisch feststellbaren Zelluntergangs und vor der Änderung zahlreicher biochemischer Parameter; sie blieb aber ein äußerst vieldeutiges Zeichen für eine Störung, die ihren Ursprung im Ablauf der Mitose selbst wie während der Vorbereitung zur Mitose, d.h. der gesamten Interphasezeit (MAZIA 1956), nehmen konnte.

Es wurde daher in der Folgezeit versucht, den Einfluß alkylierender Substanzen auf Zellen in den einzelnen Phasen ihres Lebensablaufs von Teilung zu Teilung, dem sogenannten Generationscyclus der Zelle, aufzudecken und die Befunde den möglichen Störungen bestimmter phasenabhängiger Stoffwechselprozesse zuzuordnen (GELFANT 1963; PALME u. Mitarb. 1963; LAYDE u. BASERGA 1964; LEVIS u. Mitarb. 1965). Diese Untersuchungen wurden im wesentlichen mit Hilfe der quantitativen Histoautoradiographie durchgeführt.

2.) Zur Histoautoradiographie:

Das autoradiographische Verfahren beruht auf dem zuerst von BECQUEREL (1896) beobachteten Vermögen ionisierender Strahlen, Photoschichten zu schwärzen. Diese Eigenschaft ermöglicht es, die Strahlung radioaktiver, in biologisches Material inkorpo-

rierter Substanzen in einer Photoschicht, die im engsten Kontakt zum Untersuchungsmaterial z.B. histologischen Schnitten exponiert wird, nachzuweisen. Bei geeigneter Wahl des Photomaterials und der Belichtungszeiten kann darüberhinaus aus dem Grad der Schwärzung und der Art der Verteilung die Strahlungsquelle im biologischen Material lokalisiert und quantitativ bestimmt werden (Übersichten: BOYD 1955; SCHMEISER 1957).

Nach anfänglichen Untersuchungen, die auf den makroskopischen Bereich begrenzt blieben (Übersicht z.B. bei: HARBERS 1958), wurde die autoradiographische Technik insbesondere von LEBLOND u. Mitarb. 1943, 1946 a u. b) und PELC (1947) soweit verfeinert, daß die Verteilung radioaktiver Stoffe in mikroskopischen Größenordnungen untersucht werden konnte.

Einen entscheidenden Fortschritt machte das Verfahren durch die Einführung Tritium-markierter Verbindungen durch FITZGERALD u. Mitarb. (1951). $\text{Tritium (H}^3\text{)}$, ein Isotop des Wasserstoffs, empfahl sich besonders durch die äußerst geringe Reichweite seiner β -Strahlung, die im Autoradiogramm zu einem hohen Auflösungsvermögen führt. Weiterhin bot es die Vorteile einer langen Halbwertszeit von 12,4 Jahren.

Unter den Tritium-markierten Verbindungen nimmt Thymidin (TdR) einen besonderen Platz ein: Thymidin ist ein selektiver Vorläufer der Desoxyribonucleinsäure (REICHARD u. ESTBORN 1951; FRIEDKIN u. Mitarb. 1956). Von Lebewesen aufgenommenes, markiertes Thymidin wird innerhalb kurzer Zeit in Desoxyribonucleinsäure eingebaut oder zu wasserlöslichen, für die DNS-Synthese unbrauchbaren Produkten katabolisiert (POTTER 1959; ZAJICEK u. Mitarb. 1963). Andererseits bildet DNS einen stoffwechselstabilen Bestandteil des Zellkernes (REVESZ u. Mitarb. 1956; HECHT u. POTTER 1956). Damit lassen sich durch einmalige Zufuhr von $\text{H}^3\text{-TdR}$ alle die Zellen kennzeichnen, die sich während der Verfügbarkeitszeit des "Tracers" (max 30-60 min, KOBURG u. MAURER 1962) in der Phase ihrer DNS-Reduplikation befanden, und es erlaubt die bleibende "Markierung", ihren Lebensweg auch über längere Zeit hin zu verfolgen.

Darüberhinaus ist aus dem Schwärzungsgrad der Photoschicht, d.h. der Zahl der reduzierten Silberkörner über den Zellkernen auf die Menge des inkorporierten H^3 -TdR zu schließen. Diese kann wiederum im Bereich bestimmter Grenzen als Maß für die DNS-Syntheserate gelten (MAURER u. KOBURG 1961, LANG u. Mitarb. 1966).

3.) Zum Generationscyclus der Zelle: +)

Aufgrund autoradiographischer Untersuchungen wurde 1951 von HOWARD u. PELC ein Modell des Generationscyclus entworfen, das bis jetzt Grundlage zellkinetischer Untersuchungen blieb. Danach folgen im Lebensablauf einer Zelle vier Phasen aufeinander (vgl. Abb.I):

1. die postmitotische Phase (G_1), in der der DNS-Wert des Zellkernes konstant bleibt;

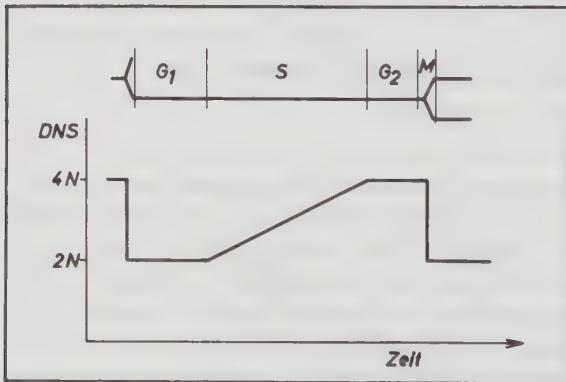


Abb.I Lineares Schema des Generationscyclus mit dem Verhalten des DNS-Wertes der Zelle in den einzelnen Phasen.

+) Synonyma: Zellcyclus, Teilungscyclus, Mitosecyclus.

2. die D N S - S y n t h e s e - Phase (S), die durch die Verdoppelung der chromosomalen DNS gekennzeichnet ist;
3. die p r ä m i t o t i s c h e Phase (G₂), d.h. die Zeitspanne vom Abschluß der DNS-Synthese bis zum Einsetzen der Zellteilung;
4. die M i t o s e - Phase (M), die die morphologisch faßbaren Stadien der Zellteilung umschließt.

Zur Bestimmung der Dauer einzelner Phasen wird vielfach die "markierte - Mitosen" -Methode herangezogen, die auf der Beobachtung des Prozentsatzes markierter Mitosen (des sogenannten H³-Mitose-Index) in seinem zeitlichen Verlauf nach einmaliger H³-TdR-Gabe beruht. Dies sei kurz anhand der Abb. II demonstriert:

Nach Applikation von H³-TdR gelangen entsprechend dem Stand ihrer Entwicklung im Generationscyclus und der jeweiligen Phasendauer über eine bestimmte Zeit nacheinander nichtmarkierte

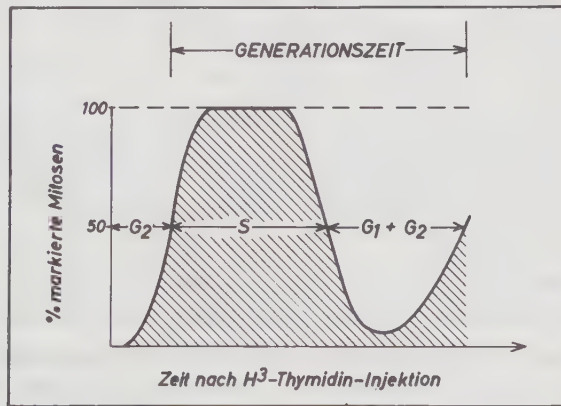


Abb.II Verlauf des Prozentsatzes markierter Mitosen (H³-Mitose-Index) nach einmaliger H³-Thymidin-Injektion.

Das schraffierte Feld gibt den Anteil der markierten Mitosen ("S-Phasenzellen") wieder. Bei der Darstellung wurde die Mitosedauer in die G₂-Phasenzeit einbezogen. Zeitliche Relation der Phasen wie in Abb. I.

(G₂-), markierte (S-), dann wieder nichtmarkierte (G₁-) Zellen u.s.w. zur Teilung.

Aus dem zeitlichen Abstand von H³-TdR-Gabe und dem Auftreten markierter Mitosen ist daraus die Dauer der G₂-Phase (die mittlere Dauer beim 50 % Wert) und aus der Zeitspanne vom Anstieg des H³-Mitoseindex bis zum Abfall die Dauer der S-Phase abzulesen. Weiterhin läßt sich aus der zeitlichen Differenz analoger Punkte zweier aufeinanderfolgender Wellen markierter Mitosen die Gesamtdauer des Generationscyclus, die sogenannte Generationszeit, ermitteln.

Die letzte Bestimmung wird durch die bei längeren Generationszeiten erforderliche, ausgedehnte Beobachtungsdauer recht aufwendig.

Es wird daher die mittlere Generationszeit häufig sehr viel einfacher aus dem sogenannten H³-Index, d.h. dem Verhältnis markierter Zellen zu den Gesamtzellen, ermittelt (u.a. QUASTLER 1963, SCHULTZE u. OEHLERT 1960).

Der H³-Index gibt den Anteil der Zellen wieder, die sich während der Verfügbarkeitszeit zugeführten H³-Thymidins in der S-Phase befanden. Zugleich ist er bei asynchron wachsenden Zellpopulationen Ausdruck für die zeitliche Relation von S-Phasenlänge zu den sogenannten Ruhephasenlängen (G₁ und G₂) bzw. zur Generationszeit.

Ist die Dauer der S-Phase bestimmt, so läßt sich aus dem H³-Index die mittlere Generationszeit abschätzen.

Ein solches Bestimmungsverfahren ist allerdings nur zulässig, wenn der Anteil, der an der Proliferation teilnehmenden Zellen einer Population annähernd bekannt ist. Dieser kann z.B. durch kontinuierliche Zufuhr von H³-TdR (MENDELSON 1962) oder mehrfache Applikation in kürzeren Zeitabständen (BASERGA u. Mitarb. 1960) bestimmt werden. Über eine längere Versuchszeit hin werden alle die Zellen durch die Markierung erfaßt, die sich in der S-Phase befanden oder in die S-Phase eintraten. Da die Verdoppelung der chromosomalen DNS im Allgemeinen Zeichen für die Teilungsbereitschaft der Zelle ist (SWANN 1957, DEFENDI u.

MANSON 1963, MAZIA 1963), gilt das gefundene Maximum des H^3 -Index als ein Maß für die Proliferationsaktivität der betreffenden Zellpopulation.

Von einer größeren Anzahl von Autoren werden weitere autoradiographische Bestimmungsmethoden des Generationscyclus und seiner einzelnen Phasen beschrieben (Übersichten: BASERGA 1965, LALA u. Mitarb. 1965). Diese stützen sich z.B. auf die Beobachtung der Abnahme der Markierungsintensität über den Zellkernen, die durch sukzessive Zellteilung bewirkt wird (MARUYAMA 1963), auf die kombinierte Anwendung von Tritium-markierten Thymidin und Colchicin (VAN'T HOF u. YING 1964) oder doppelte Markierung mit H^3 - und C^{14} -markiertem Thymidin. (PILGRIM u. MAURER 1962, WIMBER u. QUASTLER 1963). Das oben näher erläuterte Verfahren, besonders die Untersuchung und Deutung des H^3 -Mitose-Index hat darüber nicht an Bedeutung verloren, sondern gilt weiterhin als eine recht zuverlässige, wenn nicht sogar die genaueste autoradiographische Methode zur Untersuchung zellkinetischer Vorgänge (QUASTLER 1963, BASERGA 1965).

Im vergangenen Jahrzehnt wurde mit Hilfe der autoradiographischen Technik der Generationscyclus zahlreicher Zellarten von Säugetiergeweben untersucht. Es ergab sich sowohl für normale wie Tumorgewebe ein recht einheitliches Bild (Übersichten: KOBURG u. MAURER 1965, BASERGA 1965): S-, G_2 - und Mitose-Phase laufen in einem relativ konstanten Zeitraum ab, während die G_1 -Phase eine große zeitliche Variationsbreite aufweist. Die Dauer der S-Phase wurde zwischen 5 Stunden (PRATT u. MALONEY 1959) und 30 Stunden (SHERMAN u. Mitarb. 1960) mit einem Häufigkeitsmaximum bei 7 bis 8 Stunden gefunden.

Zum Durchlaufen der G_2 -Phase benötigen Zellen bis auf Ausnahmen (GELFANT 1962, STARKEY 1963, CAMERON u. CLEFFMAN 1964) Zeiten, die unter denen der S-Phasendauer liegen. Die Mitose wird innerhalb von 30 min bis 2,5 Stunden vollzogen. Die Wachstumsgeschwindigkeit von Geweben wird überwiegend durch die Veränderung der G_1 -Phasenlänge reguliert. Diese kann von einer

Stunde über Monate bis zu unbestimmbar langen Zeiträumen reichen.

Die Untersuchung des Generationscyclus der Zelle hat wesentlich zum Verständnis normaler und pathologischer Wachstumsvorgänge beigetragen. Darüberhinaus werden z.Zt. vielfach Schritte unternommen, die Bestimmung von Wachstumscharakteristika unter Anwendung autoradiographischer Methoden im klinischen Bereich zur Diagnostik und Therapie neoplastischer Erkrankungen nutzbar zu machen (Übersicht: OEHLERT u. LESCH 1966).

4.) Zur Aufgabenstellung:

Im Zuge der Bemühungen, den Angriffspunkt alkylierender Cytostatica im Stoffwechsel der Zelle aufzudecken wurde von PALME u. Mitarb. (1964) die Wirkung von Cyclophosphamid auf den Generationscyclus von Dünndarmepithelzellen der Maus untersucht.

Es bestätigte sich der oben erwähnte, mit autoradiographischen und biochemischen Methoden erhobene Befund, daß Zellen in der DNS-Synthese-Phase recht empfindlich auf alkylierende Substanzen reagieren (PALME u. Mitarb. 1963; LISS u. PALME 1964). Darüberhinaus aber fand sich ein Einfluß auf die G_2 -Phase, der sich in einer Verlängerung auf das Doppelte der normalen Verlaufsdauer äußerte. Dieser Effekt trat schon bei Dosen auf (50 mg/kg), die eben erst zu Auswirkungen an der DNS-Synthese führten.

Untersuchungen an intraperitoneal wachsenden EHRLICH-Ascites-Tumorzellen (EAT) ergaben, daß die Proliferationsaktivität gemessen an der Transplantabilität der Tumorzellen durch Einwirkung von Cyclophosphamid in einem Dosisbereich stark herabgesetzt wird, in dem sich die eben genannten Wirkungen bei Normalgeweben zeigten (LISS u. PALME 1965). Eine Wachstumshemmung von EAT-Zellen durch Cyclophosphamid wurde zuvor von KOVACS u. Mitarb. (1960) beschrieben. Sie beobachteten, daß die Zellteilungsrate erst viele Stunden nach Applikation des Cytostatikums abnahm, und sie deuteten den Befund dahin, daß die Schädigung der Zelle in einem Entwicklungsstadium längere Zeit vor Eintritt in die Mitose gesetzt werde.

Der ihrer Vermutung nach sensible Abschnitt

im Generationscyclus wurde nicht näher bestimmt.

Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, einen tieferen Einblick in den Vorgang der Mitosehemmung und damit der "Cytostase" zu gewinnen. Dazu wurde mit Hilfe der quantitativen Histoautoradiographie der Einfluß von Cyclophosphamid auf einzelne Phasen des Generationscyclus von EHRLICH-Ascites-Tumorzellen untersucht.

Es war dabei von besonderem Interesse, ob und wieweit die bei Normalgeweben beobachtete Verlängerung der G_2 -Phase eine Entsprechung bei EHRLICH-Ascites-Tumorzellen findet. Die Ergebnisse beim Normalgewebe hatten offengelassen, ob es sich bei der Hemmung der G_2 -Phase durch Cyclophosphamid um einen unmittelbaren Effekt oder um die Folgeerscheinung einer in der voraufgehenden Phase gesetzten Schädigung handelte. Auch darüber sollten die Untersuchungen am EHRLICH-Ascites-Tumor - bei Vorliegen einer derartigen Störung - näheren Aufschluß geben.

II. Material und Methode =====

A. Material:

Der im Versuch verwendete hypotetraploide ELT-EHRLICH-Ascites-Tumorstamm (durchschnittliche Chromosomenzahl:63) wird im hiesigen Institut seit einigen Jahren unter gelegentlicher Einschaltung solider Passagen in wöchentlichen Abständen transplantiert. Als Tumorträger dienen junge, weiße Mäuse des CF₁-Inzuchtstammes mit einem durchschnittlichen Gewicht von 24 g, die mit Wasser und Futter (ALTROMIN) ad libitum ernährt werden.

H³-TdR (spez. Aktivität 1,9 Ci/mM) wurde von Schwarz Bio Research Inc., Orangeburg N.Y., bezogen. Cyclophosphamid (ENDOXAN, Fa. ASTA, Bielefeld) wurde wenige Minuten vor Applikation den handelsüblichen Ampullen entnommen und in aqua bidest. gelöst.

B. Autoradiographische Methode:

1) Herstellung der Autoradiogramme: Ein Teil der Ausstrich-

präparate (s.u.) wurde vor Herstellung der Autoradiogramme nach FEULGEN (Hydrolyse 1n HCl, 60°, 4 Min) gefärbt. FEULGEN-vorgefärbte und ungefärbte Präparate wurden z.T. nach der sogenannten "stripping-film"-Technik (PELC, 1947) mit AR 10-Film (KODAK) bezogen. Die Mehrzahl der Präparate wurde durch Stippen in eine Photoemulsion K 2 oder G 5 (ILFORD), die kurz vor Verwendung im Wasserbad bei 45° in gleichen Anteilen Wasser gelöst wurden, mit einer Photoschicht überdeckt (Methode nach MESSIER u. LEBLOND 1957). Dieses Verfahren wurde bevorzugt angewandt, da es vor der stripping-film Methode den Vorteil leichter Handhabung und grösserer Wirtschaftlichkeit bietet. Es ließ sich zudem durch geeignete Verdünnung der Photoemulsion eine Schichtdicke herstellen, die es erlaubte, das Zellmaterial im Autoradiogramm besser anzufärben und zu differenzieren.

Die gestippten wie die stripping-film-Präparate wurden einige Stunden getrocknet und danach in lichtdichten Kästen unter Ein-schluß eines Trockenmittels (CaCl_2) im Kühlschrank exponiert. Die Expositionszeit betrug zwischen 4 und 20 Tagen. Die Präparate wurden mit den Entwicklern KODAK DB 19 (stripping-film) und frisch zubereitetem Amidol (K 2- und G 5-Emulsionen) nach Vorschrift entwickelt, in normalem Fixierbad fixiert und gewässert. Im Anschluß daran wurden die Autoradiogramme mit Hämalaun nachgefärbt und mit Eukitt oder Glyceringelatine einge-deckt.

2) Auswertung der Autoradiogramme: Bestimmt wurden

- 1) H^3 -Index,
- 2) Mittlere Silberkornzahl über den Interphasekernen (Agk/IK),
- 3) H^3 -Mitose-Index,

Zu 1)

Der H^3 -Index, d.h. der prozentuale Anteil markierter Zellen an der Gesamtzellzahl, wurde durch Auszählung von 2.000 Zellen unter willkürlicher Auswahl des Zählgebietes bestimmt. Zur Auswertung empfahlen sich besonders die mit G 5-Emulsion aufgesetzten Präparate wegen der großen Empfindlichkeit dieser Pho-

toemulsion. Durch Variation der Belichtungszeiten wurde eine möglichst gleiche und relativ hohe Silberkornzahl über den Kernen aus behandelten und unbehandelten Gruppen angestrebt. Als "markiert" galten Kerne mit mindestens 5 Silberkörnern über der Hintergrundschwärzung ("background") gleich großer Flächen der Umgebung. Der background betrug in den meisten Autoradiogrammen weniger als 10 Silberkörner in einem Feld von $50 \times 50 \mu$ Größe. Dies entspricht < 1 Silberkorn pro nichtmarkiertem Interphasekern.

Zu 2)

In Autoradiogrammen gleicher Belichtungszeit, die mit dem Photomaterial einer Charge aufgesetzt waren, wurden die Silberkörner über 100 Interphasekernen ausgezählt. Als besonders geeignet erwies sich infolge der geringen Silberkorngröße und der konstanten Photoschichtdicke der stripping-film.

Zu 3)

Der H^3 -Mitose-Index, d.h. der prozentuale Anteil der markierten Mitosen an der Gesamtzahl der Mitosen, wurde an je 50 bis 150 Mitosen in FEULGEN vorgefärbten Autoradiogrammen bestimmt, die mit K 2-Emulsion aufgesetzt und relativ lange belichtet waren. Unter dieser feinkörnigen Photo-Emulsion waren auch bei der angestrebten hohen Silberkornzahl die Mitosefiguren gut zu erkennen.

Es wurden außerdem in FEULGEN u. Hämalaun gefärbten Ausstrichpräparaten, die nicht dem autoradiographischen Verfahren unterworfen waren, die EAT-Zellen hinsichtlich der morphologischen Veränderungen untersucht, und die Zahl der Mitosen pro 1000 Zellen, der sogenannte Mitose-Index bestimmt. Dazu wurden je 3000 Zellen ausgezählt.

Da sich eine Differenzierung von Prophasen und späten Telophasen zu Interphasekernen unbehandelter und mehr noch behandelter EHRLICH-Ascites-Zellen als äußerst unsicher erwies, beschränkte sich die Zählung auf die deutlich erkennbaren Mitosestadien: Meta-, Ana- und frühe Telophasen. In ähnlicher Weise wird von anderen Untersuchern vorgegangen (YAMADA u. PUCK 1961; DEWEY u. HUMPHREY 1962).

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des t-Testes (STUDENT-Verteilung) durchgeführt: Die Standardabweichung wurde nach der Formel (1), die Signifikanz der Mittelwertdifferenzen nach den Formeln (2) u. (3) berechnet:

$$(1) \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}; \quad (2) \quad t = \frac{\bar{x} - \bar{x}'}{s_D}$$

$$(3) \quad s_D = s_{x,x'} \sqrt{\frac{N + N'}{N N'}}$$

C. Versuchsanordnung:

1. Allgemeines: Die Untersuchung wurde 7 Tage nach Inokulation von 0,1 ml Original-Ascites begonnen. H^3 -TdR und Cyclophosphamid wurden in etwa gleichen Mengen physiologischer NaCl bzw. aqua bidest. (0,2 ml) intraperitoneal injiziert. Bei den unter weitgehend sterilen Bedingungen durchgeführten Punktionen wurden je ca. 0,05 ml Ascitesflüssigkeit entnommen. Die Tiere wurden bei Versuchsende durch Dekapitation getötet. Die durch Punktion bzw. nach Tötung der Tiere und Eröffnung der Bauchhöhle gewonnenen Asciteszellen wurden ausgestrichen, luftgetrocknet und 10 min in Methanol fixiert.

2. Aufbau der einzelnen Versuche:

Versuch IA:

Je 6 Ascites-Tumor-tragenden Mäusen wurden 30 bzw. 60 mg/kg Körpergewicht Cyclophosphamid i.p. injiziert. 6 Stunden später folgte für alle Tiere die Injektion von 1,5 μ Ci/g Körpergewicht H^3 -TdR. Es wurden dann die Kollektive in je 2 gleiche Gruppen geteilt, die in 2-stündigem Abstand - bei der ersten von 4-14 Stunden, der zweiten von 8-24 Stunden nach H^3 -TdR-Injektionen - punktiert wurden. Von sechs unbehandelten tumortragenden Tieren, die ebenfalls in zwei Gruppen aufeinanderfolgten, wurde zu den folgenden Zeiten nach H^3 -TdR-Gabe Ascitesflüssigkeit durch Punktion gewonnen: In der ersten Gruppe in halbstündigem Intervall von der 1.-4. Stunde nach H^3 -TdR-Injektion, in der darauffolgenden Gruppe von der 4.-18. Stunde alle 2 Stunden.

Versuch IB:

Zwei weitere Versuchstiere erhielten 20 min vor der Applikation von 60 mg/kg Cyclophosphamid ebenfalls 1,5 μ Ci/g Körpergewicht H^3 -TdR und wurden 2-14 Stunden später in zweistündigem Abstand punktiert.

Versuch II:

Je drei Tiere wurden mit Cyclophosphamid mit der Dosis von 30, 60 und 120 mg/kg behandelt und erhielten 5 Stunden später eine erste H^3 -TdR-Injektion von 15μ Ci/Maus. Nach einer in 60-minütigem Abstand eingeschalteten Panktion folgten weitere H^3 -Thymidin-Injektionen von je 15μ Ci/Maus 9, 16, 23 Stunden nach Applikation des Cyclophosphamids. 60 Minuten nach der letzten H^3 -TdR-Gabe, 24 Stunden nach Versuchsbeginn, wurde erneut Ascitesflüssigkeit entnommen. In gleicher Weise wurde mit einer Gruppe von drei unbehandelten Tieren verfahren.

III. E r g e b n i s s e

=====

Die Zellen des im Versuch verwendeten ELT-Stammes zeigten im Ausstrich die mehrfach zuvor für EHRLICH-Ascites-Tumor-Zellen beschriebene Polymorphie von Kern und Cytoplasma bei einem Überwiegen runder bis schwach ovaler Kerne mit schmalem Cytoplasmasaum (vgl. Abb. IIIa) (SEEGER 1937, PIRWITZ u. Mitarb. 1949, HOMANN 1952). Neben mehr- und riesenkernigen Tumorzellen fanden sich vereinzelt Fremdzellen - vorwiegend Leukocyten - , die von Tumorzellen gut zu differenzieren waren.

Nach Behandlung mit 30 und 60 mg/kg Cyclophosphamid war das Bild der Interphasezellen über einen Beobachtungszeitraum von 24 Stunden unauffällig. Dagegen waren schon 6 Stunden nach Applikation von 120 mg/kg deutliche Veränderungen in der Gestalt der Tumorzellen (u.a. Chromatinverdichtungen an der Kernmembran, Vergrößerung und Abblassung des Kernes) zu beobachten. 18 Stunden später fanden sich weiterhin zahlreiche in Auflösung begriffene "verdämmernde" Zellkerne.

Während erst eine relativ hohe Dosis Cyclophosphamid zu einer frühen sichtbaren Schädigung der Interphasezellen führte, wurden Störungen des Mitoseablaufs schon durch geringere Dosen (30 und 60 mg/kg) bewirkt.

Als Kriterium einer Störung galten die - auch im Ausstrich eindeutig differenzierbaren - Anomalien von Anaphasen und frühen Telophasen wie Chromosomenbrücken oder Chromosomenfragmente.

Mitosefiguren mit singulären Veränderungen dieser Art traten nicht selten (ca. 10 % der gesamten Ana- und Telophasen) auch bei unbehandelten EAT-Zellen auf. Ihre Zahl blieb dabei über die gewählten Versuchszeiten nach Einbau des markierten Thymidins annähernd konstant.

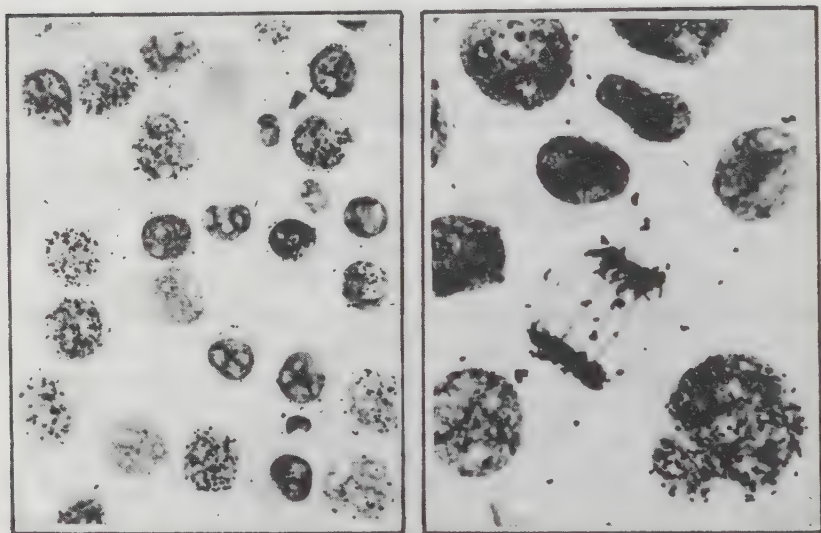


Abb. III: Autoradiogramme von EHRLICH-Ascitestumor-Zellausstrichen, Emulsion G 5 (ILFORD); FEULGEN-Färbung;

- a) Unbehandelte EAT-Zellen 90 min nach H^3 -TdR-Injektion (Planopo. Num. Apert. 1,0 Ölimmers).
- b) Anaphase mit Chromosomenbrücken und Chromosomenfragmenten 24 Stunden nach Behandlung mit 60 mg/kg Körpergewicht Cyclophosphamid, 18 Stunden nach H^3 -TdR-Injektion (Planapo. Num. Apert. 1,3 Ölimmers).

In den ersten 6 Stunden nach Einwirkung aller verwendeten Dosen Cyclophosphamid waren die Ana- und Telophasenfiguren gegen die Kontrollen nicht verändert. Eine Häufung pathologischer Mitosefiguren war erst zu späteren Zeiten zu beobachten. So

stieg der Anteil der Mitoseanomalien 24 Stunden nach Gabe von 60 mg/kg auf ca. 50 % an. Zugleich nahm der Grad der Schädigung deutlich zu (vgl. Abb. III b).

H³-Index: Über das Verhalten des H³-Index unter Einwirkung von Cyclophosphamid gibt Tab. I Auskunft. Nach einmaliger H³-TdR-Injektion betrug der H³-Index unbehandelter EAT-Zellen 53,6 % ($\pm 5,3$).

Cyclophosph. mg/kg KG	H ³ -Index			
	H ³ -TdR einmalig		H ³ -TdR mehrfach	
	$\pm s$		$\pm s$	
Kontrolle	53,6	5,3	91,6	7,7
30	54,4	4,7	81,8	11,3
60	51,2	7,2	93,4	5,5
120	51,0 *	2,0	95,9	4,6

Tab.I: Einfluß verschiedener Dosen Cyclophosphamid auf den H³-Index von EHRLICH-Ascites-Tumorzellen nach einmaliger i.p. H³-TdR Inj. (6 Stunden (*5 Std) nach Cyclophosphamid) und mehrfachen H³-TdR Inj. (5, 9, 16, 23 Stunden nach Cyclophosphamid).

Cyclophosphamid blieb bei allen angewandten Dosen (30, 60, 120 mg/kg) ohne Einfluß auf die Höhe des H³-Index, wenn H³-TdR 6 Stunden nach Gabe des Cyclophosphamid injiziert wurde (Exp. I A.).

Bei mehrfacher Markierung mit H³-TdR beginnend 5 Stunden nach Applikation von 60 und 120 mg/kg Cyclophosphamid (Exp. II) war ebenso keine wesentliche Änderung des Prozentsatzes markierter Zellen zu den Kontrollen zu beobachten. Bei der Beurteilung des gegen die Kontrollen gering verminderten H³-Index nach Gabe von 30 mg/kg sind die relativ großen Standardabweichungen zu berücksichtigen.

Diesen Daten ist zu entnehmen, daß durch die Behandlung mit Cyclophosphamid das Verhältnis von Zellen in der S-Phase zu

solchen der "Ruhephasen" (G_1 - und G_2 -Phase) nicht verschoben wird und demgemäß die Relation der Phasendauern zumindest in den ersten Stunden nach Behandlung erhalten bleibt.

Da der Zuwachs des H^3 -Index bei mehrfacher H^3 -Thymidin-Gabe als ein Maß für die Zahl der Zellen gelten kann, die während der Versuchsdauer in die S-Phase eingetreten sind, lassen die Befunde weiterhin erkennen, daß EAT-Zellen durch die Einwirkung selbst hoher Dosen Cyclophosphamid nicht auf ihrem Weg durch die G_1 -Phase oder im Übergang zur S-Phase blockiert werden.

Silberkornzahl/Interphasekern: Anders als der H^3 -Index ließ die mittlere Silberkornzahl über den Interphasekernen eine deutliche Abhängigkeit von der Einwirkung des Cyclophosphamid erkennen (vgl. Tab. II).

Cyclophosph. mg/kg KG	Silberkornzahl/Interphasekern		
		$\pm s$	P
Kontrolle	100,0	16,0	-
30	84,3	20,3	-
60	46,9	12,7	<0,001
120	36,3*	4,0	<0,001

Tab. II: Einfluß verschiedener Dosen Cyclophosphamid auf die mittlere Silberkornzahl über den Interphasekernen von EHRLICH-Ascites-Tumorzellen. H^3 -TdR Inj. 6 Stunden (*5 Std) nach Cyclophosphamid.

6 Stunden nach Gabe von 60 mg/kg Cyclophosphamid fand sich eine signifikante Verminderung der Silberkornzahl auf 46,9 % ($\pm 12,7$) der Kontrollwerte. Eine Verdoppelung der Dosis führte schon nach 5 Stunden zu einer weiteren Herabsetzung auf 36,3 % ($\pm 4,0$) der Kontrollen. Nach Applikation von 30 mg/kg war die Abnahme der Silberkorndichte über den Kernen nicht mit Sicherheit nachzuweisen.

In Anbetracht der Abhängigkeit, die zwischen der Silberkornzahl/Interphasekern, dem H^3 -Thymidin-Einbau und der DNS-Syntheserate besteht (vgl. Seite 4), ist aus den genannten Befunden auf eine dosisabhängige Herabsetzung der DNS-Syntheserate unter Einwirkung von Cyclophosphamid zu schließen. Eine unmittelbare Übertragung der gefundenen Werte auf die Größe der DNS-Syntheserate kann nur mit Einschränkung vorgenommen werden, da infolge der hohen Absorption der β -Strahlen des Tritiums die u.U. behandlungsabhängige Zellgröße, Cytoplasmadichte und Verteilung des chromosomalen Materials im Ausstrich nicht ohne Einfluß auf die Zahl der Silberkörner/Interphasekern sind. (KOBURG u. MAURER 1962). Bei den vorliegenden erheblichen Differenzen zwischen den Werten (60 und 120 mg/kg zu den Kontrollen) ist dieser Vorbehalt jedoch ohne wesentliche Bedeutung bei der Beurteilung der Befunde.

H^3 -Mitose-Index: Die ersten markierten Mitose-Figuren (Meta- und Anaphasen) traten bei unbehandelten EAT-Zellen 1,5 Stunden nach H^3 -TdR-Injektion auf. Markierte Telophasen folgten nach 30 Minuten. Prophasen wurden aus den oben genannten Gründen (Seite 11) nicht berücksichtigt.

Von der 2. Stunde nach H^3 -TdR-Gabe an nahm der Anteil der markierten Mitosefiguren kontinuierlich zu (Abb. IV, Kurve I), überschritt 5,2 Stunden nach H^3 -TdR den 50 %-Wert und näherte sich etwa nach 8 Stunden einem Plateau von 90 - 97 %.

Abb. IV demonstriert den Verlauf des H^3 -Mitose-Index nach Behandlung der EAT-Zellen mit 30 mg/kg (Kurve II) bzw. 60 mg/kg (Kurve III) Cyclophosphamid 6 Stunden vor der H^3 -TdR-Markierung.

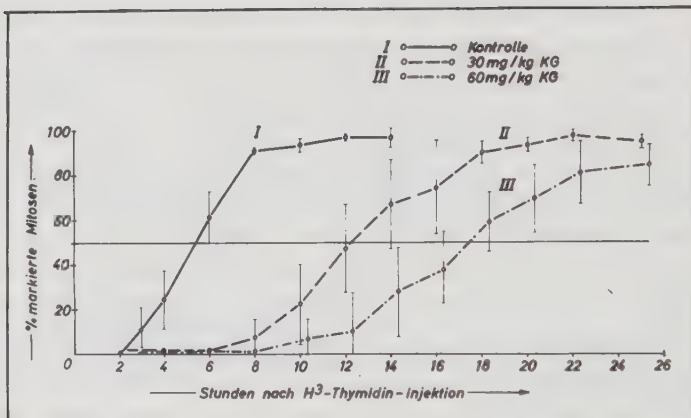


Abb. IV: Verhalten des H^3 -Mitose-Index über die Zeit nach einmaliger H^3 -TdR-Injektion, 6 Stunden nach Applikation verschiedener Dosen Cyclophosphamid (Mittelwert $\pm$ s).

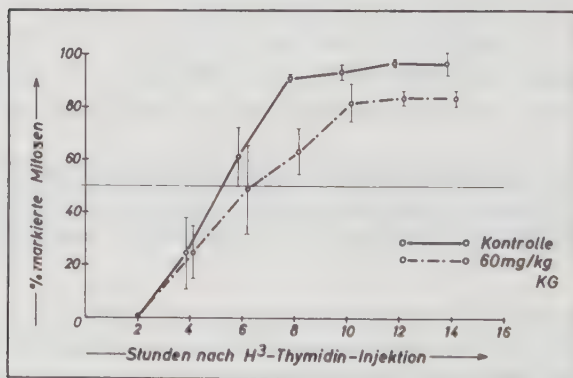


Abb. V: Verhalten des H^3 -Mitose-Index über die Zeit nach einmaliger H^3 -TdR-Injektion, 20 min vor Applikation von 60 mg/kg KG (Mittelwert $\pm$ s).

Während der ersten sechs Stunden (30 mg/kg) bzw. acht Stunden (60 mg/kg) nach Markierung waren keine markierten Teilungsfiguren zu beobachten. Erst nach dieser Zeitspanne erfolgte eine gegen die Kontrolle verlangsamte Zunahme des H^3 -Mitose-Index. Unter Einwirkung von 30 mg/kg erreichte der H^3 -Mitose-Index 18 Stunden nach H^3 -TdR-Injektion einen Wert von ca. 90 %, während er unter 60 mg/kg nach 24 Stunden nur an 85 % herankam.

Wurde H^3 -TdR 20 Minuten vor Applikation von 60 mg/kg Cyclophosphamid injiziert (Versuch IB), so verlief der H^3 -Mitose-Index bis zur 6. Stunde im Bereich der Norm (Abb. V). 2 Stunden später war er signifikant gegen die Kontrollen vermindert, und blieb bis zur 14. Stunde - dem Ende der Beobachtungszeit - um etwa 10 % unter den Kontrollwerten.

Die zeitliche Differenz zwischen H^3 -TdR-Injektion und dem Anstieg des H^3 -Mitose-Index gibt - gemessen am 50 %-Wert - die mittlere Dauer der G_2 -Phase wieder (vgl. S 5). Demnach ist aus dem Verlauf der H^3 -Mitose-Indices nach Behandlung (vgl. Kurve II und III in Abb. IV) zu ersehen, daß die mittlere G_2 -Phasendauer durch Cyclophosphamid erheblich verlängert wird, und zwar nach 30 mg/kg auf 12,3 Stunden und nach 60 mg/kg auf 16,5 Stunden gegenüber der normalen Dauer von 5,2 Stunden (vgl. Kurve I in Abb. IV).

Dies gilt für Zellen, die sich 6 Stunden nach Applikation des Cytostatikums am Ende der S-Phase oder in der G_2 -Phase befanden. Wie Abb. V zeigt, wird die G_2 -Phase unter der unmittelbaren Wirkung von Cyclophosphamid weitgehend normal durchlaufen. Es finden sich allerdings zu längeren Zeiten hin vermehrt nichtmarkierte " G_2 -Phasenzellen", die verzögert zur Teilung gelangen.

Mitose-Index: Die Zahl der Mitosen (Ana-Meta- und Telophasen) pro 1000 Zellen betrug bei unbehandelten Ascites-Tumor-Zellen im Mittel 21,6 %. Sie wies von Tier zu Tier schon innerhalb der Kontrollgruppe bei Auszählung von 3000 Zellen/Tier erhebliche Differenzen auf (zwischen 15 und 30 %). Eine Schwankungsbreite des Mitose-Index von gleichem Ausmaß wurde bei unbehandelten EHRLICH-Ascites-Zellen im Stadium des exponentiellen Wachstums von BASERGA (1963) und LENNARTZ und MAURER (1964) gefunden, die mit NISHIMURA und BAUM (1957), LAYDE und BASERGA (1965) einen mittleren Mitose-Index von 20 - 27 % angeben.

Abb. V zeigt das Verhalten des Mitose-Index nach Einwirkung von 30, 60 und 120 mg/kg Cyclophosphamid über 36 Stunden.

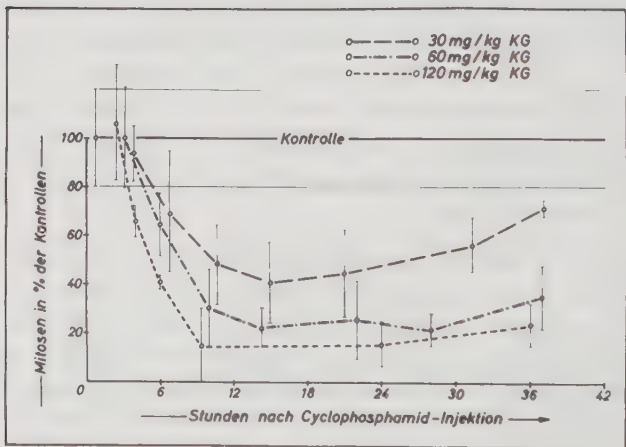


Abb.V: Verhalten des Mitose-Index über die Zeit nach Einwirkung verschiedener Dosen Cyclophosphamid (Mittelwerte $\pm$ s).

2,5 bis 3 Stunden nach Applikation von Cyclophosphamid war bei allen verwendeten Dosen keine größere Abweichung des Mitose-Index zu beobachten. Eine signifikante Herabsetzung der Mitosezahl fand sich 6 Stunden nach Einwirkung von 60 mg/kg (auf $65,4 \% \pm 13,5$ der Kontrollwerte) bzw. schon 4 Stunden nach 120 mg/kg (auf $66,5 \% \pm 6,3$).

Die Mitose-Indices erreichten etwa 12 Stunden nach Injektion von Cyclophosphamid ihr dosisabhängiges Minimum und zwar nach 30 mg/kg ca. 40 %, nach 60 mg/kg ca. 23 % und nach 120 mg/kg ca. 15 % der Kontrollwerte. Während der weiteren 24-stündigen Beobachtungsdauer blieb die Mitosefrequenz bei den höheren Dosen unverändert niedrig und stieg selbst nach 30 mg/kg nur zögernd auf ca. 70 % der Kontrollwerte an.

IV. D i s k u s s i o n

=====

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden für die Generationszeit und die Dauer der einzelnen Phasenabschnitte des im Versuch verwendeten EAT-Stammes die Werte zugrundegelegt, die von PALME (1965) in früheren Untersuchungen u.a. nach der eingangs beschriebenen "markierte-Mitose"-Methode ermittelt wurden. Danach setzt sich die Gesamtdauer des Generationscyclus der Ascites-Tumorzellen 7 Tage nach Transplantation von 37 Stunden wie folgt zusammen: Postmitotische Phase (G_1) = 11 Stunden; DNS-Synthese-Phase (S) = 20 Stunden; prämitotische Phase (G_2) = 5 Stunden, Mitosephase (M) = 1 Stunde. Die Schwankungsbreite der einzelnen Phasen betrug etwa 25 % der Mittelwerte. Dies entspricht den Abweichungen, die auch bei schnellproliferierenden Normalgeweben der Maus gefunden wurden (QUASTLER u. SHERMAN, 1959).

Die oben angegebenen Werte sind in weitgehender Übereinstimmung mit den von BASERGA u. Mitarb. (1965) beschriebenen Pha-

senlängen. Von anderen Untersuchern wurden z.T. kürzere Generationszeiten beobachtet. (Übersicht bei BERTALANFFY u. Mitarb. 1965). Die unterschiedlichen Angaben sind wahrscheinlich auf die besonderen Eigenschaften des jeweils verwendeten EAT-Stammes und auf den differenten Zeitpunkt der Untersuchung nach Transplantation zurückzuführen. -

Es wurde bei den durchgeführten Bestimmungen davon ausgegangen, daß die untersuchten EAT-Zellen

1. insgesamt an der Proliferation teilnehmen und
2. asynchron wachsen,

d.h. keine Teilsynchronisation bedingt durch eine tageszeitliche Schwankung der Mitoseaktivität aufweisen.

Der in Versuch II nach mehrfacher Markierung verbleibende Rest nichtmarkierter Zellen (8,6 %) bedeutet eine geringe Einschränkung der erstgenannten Voraussetzung. Er ist möglicherweise durch den Anteil von Zellen höherer Ploidiestufe (5-10 % der untersuchten EAT-Zellpopulation) bedingt, die nach Befunden von DEFENDI u. MANSON (1963) und LENNARTZ u. Mitarb. (1966) gegenüber den Zellen niederer Ploidie eine etwas längere Generationszeit aufweisen. Bei Fortführung der H^3 -TdR-Injektionen ist sehr wahrscheinlich mit einer weiteren Zunahme des H^3 -Index zu rechnen.

Legt man bei der Bestimmung der Generationszeit aus der S-Phasendauer (20 Std) und dem H^3 -Index (53,6) an Stelle einer 100%-igen Teilnahme der Zellen an der Proliferation den Wert von 91,4 zugrunde, so errechnet sich eine Dauer von 34,1 Stunden statt 37,3 Stunden. In Anbetracht der erheblichen Schwankungen der Generationszeit von Tier zu Tier wurde diese Differenz vernachlässigt.

Eine tageszeitliche Rhythmik der Mitoseaktivität, die von POHLE u. Mitarb. (1961) diskutiert wurde, konnte weiterhin in neueren, eingehenden Untersuchungen, die von LENNARTZ u. Mitarb. (1964) mit Hilfe von H^3 - und C^{14} -Thymidin und von BERTALANFFY u. Mitarb. (1965) mit der Colchicin-Technik durchgeführt wurden, bei intraperitoneal wachsenden EAT-Zellen nicht festgestellt werden.

Es scheint insgesamt, daß die untersuchten EAT-Zellen den an sie gestellten Forderungen nach einer exponentiellen, asynchronen Proliferation weitgehend genügen. -

Bei den vorliegenden Untersuchungen stand es im Vordergrund des Interesses, genaueren Einblick in den Mechanismus der Mitosehemmung durch Cyclophosphamid zu gewinnen. Damit ist die Frage nach dem Verhalten der Zellen in der Phase, die der Mitose unmittelbar vorausgeht (G_2 -), eng verknüpft.

Die Ergebnisse hatten gezeigt, daß Zellen, die 6 Stunden nach Behandlung eben die DNS-Synthese abschlossen, mit einer erheblichen Verzögerung zur Teilung gelangten. Diese Zellen waren von der Einwirkung der alkylierenden Substanz in der S-Phase getroffen worden. Da der Wirkspiegel des Cytostatikums schon nach vier Stunden auf zu geringe Werte absinkt (BROCK u. HORST 1963), um den Übergang dieser Zellen in die G_2 -Phase direkt beeinflussen zu können, ist anzunehmen, daß die Retardierung in der G_2 -Phase durch einen schon in der S-Phase gesetzten Schaden bedingt wird.

Handelte es sich dabei nur um einen passageren Effekt, so wäre mit zunehmender Normalisierung ein Ansteigen des Mitose-Index auf die Kontrollwerte oder Werte darüber zu erwarten, wie es z.B. nach Röntgenbestrahlung intraperitoneal wachsender EAT-Zellen (KIM u. EVANS 1964) oder Kulturen eines Leukämiestammes der Maus (WATANABE u. OKADA 1966) beobachtet wurde. In der vorliegenden Untersuchung fand sich dagegen nach 120 und 60 mg/kg Cyclophosphamid eine anhaltende Mitosedepression und nach 30 mg/kg nur ein zögernder Anstieg der Mitosezahlen. Dies spricht dafür, daß auch Zellen, die zu späteren Zeiten die DNS-Synthese abschließen, verzögert die G_2 -Phase durchlaufen. Allerdings geht in die Senkung des Mitoseindex evtl. eine Verlängerung der S- und G_1 -Phase ein. Darauf sei später zurückgekommen.

Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs des Mitose-Index nach Behandlung mit dem Anstieg des H^3 -Mitose-Index der Kontrollen

zeigt, daß die Abnahme der Zellteilungsrate erst nach einer Zeitspanne einsetzt, die der Dauer der G_2 -Phase entspricht.

Aus gleichlautenden Befunden, die durch autoradiographische Untersuchung der Wirkung von Stickstoff-Lost auf den Generationscyclus von Pflanzenzellen und Amnionzellen des Menschen in vitro gewonnen wurden, schlossen DAS (1963) und LEVIS u. Mitarb. (1965), daß G_2 -Phasenzellen durch die Einwirkung des alkylierenden Cytostatikums nicht in ihrem Weg zur Teilung gehindert werden.

Der Mitose-Index schien in der vorliegenden Untersuchung infolge der beträchtlichen biologischen Schwankung von begrenztem Wert für eine derart präzise Aussage. Es wurde daher in einem orientierenden Versuch (I B) die Markierung mit H^3 -TdR kurz vor Applikation von Cyclophosphamid (60 mg/kg) durchgeführt, und das Verhalten der nichtmarkierten " G_2 -Phasenzellen" unter der unmittelbaren Wirkung des Cytostatikums verfolgt. Es zeigte sich, daß neben markierten "S-Phasenzellen", die normal die G_2 -Phase durchliefen, eine größere Zahl von " G_2 -Phasezellen" verzögert zur Teilung gelangte.

Bei der Beurteilung der zeitlichen Zusammenhänge ist zu berücksichtigen, daß Cyclophosphamid nach Applikation zunächst in seine cytostatisch wirksamen Produkte umgewandelt werden muß (ARNOLD u. Mitarb. 1958). Untersuchungen von BROCK u. HOHORST (1963) ergaben, daß das Maximum des Wirkspiegels 15 min nach Injektion der alkylierenden Verbindung erreicht wird. Weiterhin fanden DRUCKREY u. Mitarb. (1963) beim Yoshida-Sarkom der Ratte einen Verlust der Transplantabilität bereits 40 min nach Applikation von 80 mg/kg Cyclophosphamid.

Bezieht man in die Betrachtung mit ein, daß sich die nichtmarkierten Zellen bei Gabe des Cytostatikums schon 20 min in der G_2 -Phase befanden, so ist den vorliegenden Daten zu entnehmen, daß EAT-Zellen in der beginnenden G_2 -Phase durch Cyclophosphamid gehemmt werden können, in den mittleren und späten Abschnitten dagegen ungestört zur Teilung gelangen.

In gleicher Weise verhielten sich nach den Befunden von LAYDE u. BASERGA (1964) intraperitoneal wachsende EAT-Zellen auf die Einwirkung von Stickstoff-Lost.

Es ist zu fragen, ob nicht neben der Hemmwirkung in der G_2 -Phase ein verzögerter Abschluß der DNS-Synthese weitere Ursache für den initialen Abfall und die anhaltende Depression der Mitoserate ist. Einen Anhalt dafür gibt die nach Einwirkung von Cyclophosphamid in einer Dosis von 60 bis 120 mg/kg erheblich herabgesetzte DNS-Syntheserate.

Da in der Regel der Zellteilung die vollständige Reduplikation der Chromosomen vorausgeht (MAZIA 1963), ist zu vermuten, daß die verminderte DNS-Syntheserate durch eine Verlängerung der Synthesezeit ausgeglichen wird. Dies wird gestützt durch zahlreiche Befunde in den letzten Jahren, aus denen hervorgeht, daß die DNS-Synthese - einmal in Gang gesetzt - bis zum Aufbau des vollen prämitotischen DNS-Gehaltes durchgeführt wurde, auch wenn die Syntheserate durch die Einwirkung alkylierender Cyto-statika stark herabgesetzt war (CHEVREMONT u. Mitarb. 1960, BREWER u. Mitarb. 1961, CASPERSSON u. Mitarb. 1965). Es wurde weiterhin in neuesten Untersuchungen die Verlängerung der DNS-Synthesephase bei entsprechend vermindertem H^3 -Thymidin-Einbau direkt nachgewiesen (PALME u. Mitarb. 1966).

Über das Verhalten der "Ruhephasen"-Zellen (G_1 u. G_2) insgesamt gibt schließlich der H^3 -Index nach mehrfacher Markierung einen ungefähren Überblick: Die Ergebnisse in Versuch II ließen erkennen, daß EAT-Zellen nach Cyclophosphamid entsprechend den Kontrollen in die S-Phase eintraten, d.h. im Verlauf der G_1 -Phase und im Übergang zur S-Phase nicht wesentlich gehemmt wurden.

Daß Zellen in der G_1 -Phase nicht unempfindlich auf exogene Noxen sind, zeigen u.a. Untersuchungen der Strahlenwirkung auf verschiedene Säugetiergewebe (LAJTHA u. Mitarb. 1958; MAK u. TILL 1963; DAVIES u. WIMBER 1963) oder des Einflusses von Actinomycin-D auf EAT-Zellen (BASERGA u. Mitarb. 1965).

Die G_1 -Phase ist wie eingangs erwähnt der Zellcyclusabschnitt, der physiologischerweise die größte zeitliche Variabilität aufweist. In ihr werden, da die übrigen Phasen relativ konstant ablaufen, die Regulationsmechanismen für die Proliferationsgeschwindigkeit von Geweben gesucht, - dies besonders in den Vorgängen, die den Beginn der DNS-Synthese kontrollieren (SWANN 1957 u. 1958). Es scheint aber, daß ein solches, offensichtlich sehr komplexes Kontrollsystem relativ stabil gegen die Einwirkung von Cyclophosphamid ist.

Die normale Eintrittsrate von der G_1 - zur S-Phase nach Behandlung läßt unbestimmt, ob die Ruhephasen mit der eingeschalteten Zellteilung regulär durchlaufen werden, oder ob nicht einige Zellen die DNS-Synthese aufnehmen, ohne zuvor durch die Teilung zu gehen. Einderartiges Verhalten ist als Resultat auf die Einwirkung alkylierender Substanzen in neuerer Zeit mehrfach beschrieben worden (LAYDE u. BASERGA 1964; LEVIS u. Mitarb. 1965; LAMPERT u. SANDRITTER 1966). Die vorliegende Untersuchung war auf einen zu kurzen Zeitraum begrenzt, um hierüber einen näheren Aufschluß geben zu können. -

Wie in den vorangegangenen Abschnitten anhand der autoradiographisch gewonnenen Ergebnisse zu zeigen versucht wurde, erfahren EAT-Zellen, die von der unmittelbaren Einwirkung des Cyclophosphamid in der G_1 -Phase und der späten bis mittleren G_2 -Phase getroffen wurden, keine wesentliche Hemmung beim Fortschreiten zur folgenden Phase. Ein erster deutlicher Effekt war an den Zellen zu beobachten, die sich bei Gabe des Cytostatikums in der S-Phase und der beginnenden G_2 -Phase befanden. Er äußerte sich in einer beträchtlichen Verlängerung der G_2 -Phase mit einer konsekutiven Abnahme der Mitosezahl und bei höheren Dosen in einer deutlichen Herabsetzung der DNS-Syntheserate.

Es liegt in Anbetracht der genannten Befunde nahe, die Ursache der Veränderungen in den Vorgängen zu suchen, die mit der Reduplikation des chromosomalen Materials und dessen Umordnung zur Teilung verbunden sind. So könnte eine direkte Alkylierung sowohl der DNS-Stränge wie der Nucleoproteine - vielleicht be-

günstigt durch die besondere Anordnung in und nach der Verdoppelungs-Phase - die beobachteten Erscheinungen im Generationscyclus hervorrufen (WHEELER 1962; FÜTTER 1965).

Diese Annahme wird durch die von LISS u. PALME (1966) gefundene niedrige Alkylierungsrate der DNS nicht ausgeschlossen: Es können u.U. schon wenige intra- oder intermolekulare Vernetzungen ("crosslinks") genügen, um eine regelrechte Teilung der DNS-Stränge zu blockieren (LAWLEY u. BROOKES 1963; ROSS 1962), wobei die DNS-Syntheserate selbst nicht unbedingt nachweislich beeinträchtigt sein muß.

Möglicherweise entspricht die in der vorliegenden Untersuchung beobachtete Verlängerung der G_2 -Phase der Zeitspanne, die benötigt wird, um die an den Chromosomen durch die Alkylierung gesetzten Schäden bis zu einem bestimmten Grad auszubessern. Dies könnte z.B. durch Abspaltung der alkylierten Gruppen und ihren Ersatz oder durch Zusammenfügen von Brüchen geschehen (LAWLEY u. BROOKES 1965; CRATHORN u. ROBERTS 1966).

Im Hinblick auf die vielfältigen Auf- und Umbauprozesse, die während der S- und G_2 -Phase in Kern und Cytoplasma stattfinden (TAYLOR 1960; BASERGA 1962; MAZIA 1963), bieten sich neben dem chromosomalen Material zahlreiche weitere Angriffspunkte für die alkylierende Wirkung des Cyclophosphamid. So ist es denkbar, daß die Hemmung der Synthese teilungsnotwendiger RNS oder Proteine, die z.T. in der S-Phase oder der frühen G_2 -Phase abgeschlossen wird (ZEUTHEN 1963; MITTERMAYER u. Mitarb. 1965), Störungen in der gefundenen Art hervorrufen.

Die vorliegende Untersuchung war im wesentlichen darauf gerichtet, die frühen und evtl. primären Veränderungen im Generationscyclus von EAT-Zellen zu erfassen. Es bleibt damit offen, welche Bedeutung die beobachteten Eingriffe in die S- und G_2 -Phase über die aktuelle Verlangsamung der Proliferation hinaus für die anhaltende cytostatische Wirkung besitzen. Eine vergleichende Prüfung im Transplantationstest ist, solange sie mit asynchron wachsenden Zellpopulationen durchgeführt wird, von sehr begrenzter Brauchbarkeit. Erfolg oder Mißerfolg der

Zellüberimpfung geben nur summarisch Auskunft über das Verhalten der Gesamtpopulation und lassen die besondere Empfindlichkeit einzelner Phasen oder Phasenabschnitte unberücksichtigt.

Ein genauerer Aufschluß über die Korrelation phasenabhängiger Störungen zu Veränderungen biochemischer Parameter einerseits und der cytostatischen Wirkung andererseits wäre vor allem von Untersuchungen mit synchronisierten Zellkulturen zu erwarten.

Z u s a m m e n f a s s u n g =====

Es wurde das Verhalten von EHRLICH-Ascites-Tumorzellen in einzelnen Phasen des Generationscyclus unter der Einwirkung des alkylierenden Cytostatikums Cyclophosphamid ("ENDOXAN") untersucht. Dies geschah mit Hilfe der quantitativen Autoradiographie unter Verwendung von H^3 -Thyminidin.

In einem Dosisbereich, in dem lichtoptisch keine Veränderungen an Interphasezellen zu beobachten waren, fand sich 6 Stunden nach Applikation des Cytostatikums eine dosisabhängige Verlängerung der prämitotischen Phase (G_2 -) auf mehr als das Doppelte (30 mg/kg KG) bzw. das Dreifache (60 mg/kg KG) der normalen Dauer von 5,2 Stunden.

Von dieser Hemmwirkung wurden Zellen getroffen, die sich bei Gabe des Cytostatikums in der S-Phase und der frühen G_2 -Phase befanden. Dagegen wurden Zellen in den mittleren und späten Abschnitten der G_2 -Phase nicht primär im Fortschreiten zur Mitose gehindert.

Ebenso war der Ablauf der Mitose in den ersten Stunden nach Verabfolgung selbst hoher Dosen Cyclophosphamid (120 mg/kg KG) unauffällig. Eine Häufung an Mitoseanomalien fand sich erst zu späteren Zeiten (12 - 36 Std) nach Gabe des Cytostatikums.

Während der Übergang der EAT-Zellen von der postmitotischen Phase (G_1 -) zur DNS-Synthese-Phase (S-) bei allen verwendeten Dosen offenbar unbeeinflusst blieb, schien die S-Phase selbst verlängert, wie u.a. aus der deutlichen Herabsetzung der DNS-Syntheserate nach Applikation von 60 und 120 mg/kg KG Cyclophosphamid geschlossen wurde.

VI. Literature

=====

1. ARNOLD, H.; BOURSEAUX, F.; BROCK, N.:
Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der
Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamidester.
Naturwissenschaften 45 (1958) 64 - 66
2. ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; BERGSAGEL, D.E.:
Chromosome damage in murine and human cells
following CYTOXAN therapy.
Texas Rep.Biol.Med. 20 (1962) 545 - 49
3. BASERGA, R.; KISIELESKI, W.E.; HALVORSEN, K.:
A study on the establishment and growth of
tumor metastases with tritiated thymidine.
Cancer Res. 20 (1960) 910 - 17
4. BASERGA, R.:
A radioautographic study of the uptake of
C 14-leucine by tumor cells in deoxyribonucleic
acid synthesis.
Biochim. Biophys. Acta 61 (1962) 445 - 50
5. BASERGA, R.:
Uptake of radioactive thymidine and cytidine
by Ehrlich ascites tumor cells in different
stages of growth.
Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 64 (1964) 1 - 12.
6. BASERGA, R.:
The relationship of the cell cycle to tumor
growth and control of cell division: A review.
Cancer Res. 25 (1965) 581 - 95
7. BASERGA, R.; ESTENSEN, R.D.; PETERSON, R.O.; LAYDE, J.P.
Inhibition of DNA sythesis in Ehrlich ascites
cells by actinomycin D.I.Delayed inhibition by
low doses.
Proc. Nat. Acad. Sci (USA) 54 (1965) 745 - 51

8. BECQUEREL, H.:
Sur les radiations émises par
phosphorescence.
Comt.Rend.Acad.Sci. 122 (1896) 420 - 21
9. BENNET, L.L., Jr.; SIMPSON, L.; SKIPPER, H.E.:
On the metabolic stability of nucleic acids
in mitotically inactive adult tissues labeled
during embryonic development.
Biochim. Biophys. Acta 42 (1960) 237 - 43
10. BERTALANFFY, F.D.; SCHACHTER, R.; ALI, J.; INGIMUNDSON, J.C.:
Mitotic rate and doubling time of intraperi-
toneal and subcutaneous Ehrlich ascites tumor.
Cancer Res. 25 (1965) 685 - 91
11. BODENSTEIN, D.; KONDRITZER, A.A.:
Effect of nitrogen mustard on nucleic acids
during embryonic amphibian development.
J.Exp.Zool. 107 (1948) 109 - 21
12. BOYD, G.A.:
Autoradiography in biology and medicine.
Academic Press Inc., Publ., N.Y. (1955)
13. BREWER, H.B.Jr.; COMSTOCK, J.P.; ARONOW, L.:
Effect of nitrogen mustard on protein and
nucleic acid synthesis in mouse fibroblasts
growing in vitro.
Biochem. Pharmacol. 8 (1961) 281 - 87
14. BROCK, N.; HOHORST, H.-J.:
Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in
vivo und in vitro.
Arzneimittel-Forsch. 13 (1963) 1021 - 31
15. BROOKES, P.; LAWLEY, P.D.:
The reaction of mustard gas with nucleic acids
in vitro and in vivo.
Biochem. J. 77 (1960) 478 - 84

16. CAMERON, I.L.; CLEFFMANN, G.:
Initiation of mitosis in relation to the
cell cycle following feeding of starved
chickens.
J. Cell Biol. 21 (1964) 169 - 74
17. CASPERSSON, T.; FARBER, S.; FOLEY, G.E.; KILLANDER, D.:
Cytochemical observations on the nucleolus-
ribosome system. Effects of actinomycin D and
nitrogen mustard.
Exp. Cell Res. 32 (1963) 529 - 52
18. CHEVREMONT, M.; BAECKLAND, E.; FREDERIC, J.:
Contribution cytochimique et histoautoradio-
graphique à l'étude du métabolisme et de la
synthèse des acides desoxyribonucléiques dans
des cellules animales cultivées in vitro.
I. Études cytophotométrique et histoautoradio-
graphique des adn des fibroblastes traités par
le myleran.
Biochem. Pharmacol. 4 (1960) 57 - 60
19. CRATHORN, A.R.; ROBERTS, J.J.:
Mechanism of the cytotoxic action of alkylating
agents in mammalian cells and evidence for the
removal of alkylated groups from deoxyri-
bonucleic acid.
Nature 211 (1966) 150 - 153
20. DAS, N.K.:
Effects of X rays and nitrogen mustard on DNA
synthesis and mitosis.
J. Cellular Comp. Physiol. 62; Suppl. 1
(1963) 146 - 48
21. DAVIES, D.R.; WIMBER, D.E.:
Studies of radiation-induced changes on cellu-
lar proliferation, using a double labelling
autoradiographic technique.
Nature 200 (1963) 229 - 32

22. DEFENDI, V.; MANSON, L.A.:
Analysis of the life-cycle in mammalian cells.
Nature 198 (1963) 359 - 61
23. DEWEY, W.C.; HUMPHREY, R.M.:
Relative radiosensitivity of different phases
in the life cycle of L-P 59 mouse fibro-
blasts and ascites tumor cells.
Radiation Res. 16 (1962) 503 - 530
24. DRUCKREY, H.; STEINHOFF, D.; NAKAYAMA, M.; PREUSSMANN, R.;
ANGER, K.:
Experimentelle Beiträge zum Dosis-Problem in
der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungswei-
se von ENDOXAN.
Deut.Med.Wochschr. 88 (1963) 715 - 21
25. EIDINOFF, M.L.; FITZGERALD, P.J.; SIMMEL, E.B.;
KNOLL, J.E.:
Intracellular localization of compounds
labeled with tritium, H^3 , by autoradiography.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 77 (1951) 225 - 29
26. FITZGERALD, P.J.; EIDINOFF, M.L.; KNOLL, J.E.; SIMMEL, E.B.
Tritium in radioautography.
Science 114 (1951) 494 - 98
27. FRIEDENWALD, J.S.; BUSCHKE, W.; SCHOLZ, R.O.; MOSES, S.G.:
Some effects of sulfur and nitrogen mustards
on cell nuclei in mammalian cornea.
Approaches to Tumor Chemotherapy AAAS,
Washington, D.C. (1947) 358 - 78
28. FRIEDKIN, M.; TILSON, D.; ROBERTS, D.W.:
Studies of deoxyribonucleic acid biosynthe-
sis in embryonic tissues with thymidine-C-14.
J.Biol.Chem. 220 (1956) 627 - 37
29. GELFANT, S.:
Initiatin of mitosis in relation to the cell
division cycle.
Exp.Cell Res. 26 (1962) 395 - 403

30. GELFANT, S.:
Inhibition of cell division: A critical and
experimental analysis.
Intern.Rev.Cytol. 14 (1963) 1- 39
31. GERHARTZ, H.:
Die klinischen Ergebnisse der Chemotherapie
mit ENDOXAN.
Acta, Unio Intern. Contra Cancrum 20 (1964)
366 - 68
32. GRUNDMANN, E.:
Allgemeine Cytologie. Eine Einführung in die
funktionelle Morphologie der Zelle.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1964)
33. HARBERS, E.:
Autoradiographie als histochemisches Untersu-
chungsverfahren. In:
Handbuch der Histochemie I/1 (1958) 400 - 598
Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart
34. HECHT, L.I.; POTTER, V.R.:
Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver.
I.The rate of deoxyribonucleic acid synthesis
in vivo.
Cancer Res. 16 (1956) 988 - 993
35. HOLZER, H.:
Wirkungsmechanismus der Cytostatica.
Deut.Med.J. 12 (1961) 312 - 317
36. HOMANN, W.:
Zur Biologie des Mäuseascitescarcinoms.
I.Mitteilung: Über die Morphologie der Zelltei-
lungsvorgänge beim Mäuseascitescarcinom.
Z.Krebsforsch. 58 (1952) 511 - 523
37. HOWARD, A.; FELC, S.R.:
Nuclear incorporation of P-32 as demonstrated
by autoradiographs.
Exp.Cell Res. 2 (1951) 178 - 87

38. KELLNER, B.:
Histological changes and their chronological sequence induced in transplanted tumors by nitrogen mustard, mustard gas, and BCM ((1,6-bis (2-chloroethylamino)-1,6-deoxy-D-mannitol dihydrochloride))
"Abstr.," Chem.Abstr. 51 (1957) 8991 - 92
39. KIM, J.; EVANS, T.C.:
Effects of X-irradiation on the mitotic cycle of EHRLICH ascites tumor cells
Radiation Res. 21 (1964) 129 - 43
40. KINDRED, J.E.:
The blood cells and the hemopoetic and other organs of dogs given intravenous injections of 2-chlorethyl vesicants.
Arch Pathol. 47 (1949) 378 - 98
41. KOBURG, E.; MAURER, W:
Autoradiographische Untersuchung mit H^3 -Thymidin über die Dauer der DNS-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus.
Biochim. Biophys Acta 61 (1962) 229 - 42
42. KOVACS, E.T.; OHNO, S.; KINOSITA, R.:
Studies on cyclophosphamide, antitumor alkylating compound. I. Effect on mouse leukemias.
J. Nat. Cancer Instit 24 (1960) 759 - 66
43. LAJTHA, L.G.; OLIVER, R.; KUMATORI, T.; ELLIS, F.:
On the mechanism of radiation effect on DNA synthesis.
Radiation Res. 8 (1958) 1-16
44. LALA, P.K.; MALONEY, MA.; PATT, H.M.:
Measurement of DNA synthesis time in myeloid-erythroid precursors.
Exp. Cell Res. 38 (1965) 626 - 34

45. LAMPERT, F.; SANDRITTER, W.:
Die Wirkung von Tryptophan-N-Lost auf DNS und
Histoproteingehalt isolierter Tumorzellkerne.
Klin. Wochschr. 44 (1966) 895 - 98
46. LANDING, B.H.; SEED, J.C.; BANFIELD, W.G.:
The effects of a nitrogen mustard ((Tris (2-
chloroethyl)-amine)) on regenerating rat liver.
Cancer 2 (1949) 1067 - 74
47. LANG, W.; PILGRIM, CH.; MAURER, W.:
Prozentualer Anteil von H^3 - oder C^{14} -Thymidin an
der DNS-Synthese von Zellarten der Maus.
Naturwissenschaften 53 (1966) 210
48. LAWLEY, P.D.; BROOKES, P.:
The action of alkylating agents on deoxyribo-
nucleic acid in relation to biological effects
of the alkylating agents.
Exp.Cell Res. (Suppl.) 9 (1963) 512 - 20
49. LAWLEY, P.D.; BROOKES, P.:
Molecular mechanism of the cytotoxic action of
difunctional alkylating agents and of resistance
to this action.
Nature 206 (1965) 480 - 83
50. LAYDE, J.P.; BASERGA, R.:
The effect of nitrogen mustard on the life cycle
of EHRLICH ascites tumor cells in vivo.
Brit. J. Cancer. 18 (1964) 150 - 58
51. LEBLOND, C.P.:
Locating iodine in tissues autoradiographically
especially after fixation by freezing and drying.
Stain Technol. 18 (1943) 159 - 63
52. LEBLOND, C.P.; BELANGER, L.F.:
Detection of radioactive phosphorus by the auto-
radiographic method in the newborn mouse.
Anat. Rec. 94 (1946 a) 542

53. LEBLOND, C.P.; GROSS, J.:
Histological localization of radioactive elements.
McGill Med. J. 15 (1946 b) 399 - 438
54. LENNARTZ, K.J.; MAURER, W.:
Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdopplung und der Generationszeit beim EHRlich-Ascites-Tumor der Maus durch Doppelmarkierung mit C^{14} - und H^3 -Thymidin.
Z.Zellforsch. Mikroskop. Anat. 63 (1964) 478 - 95
55. LENNARTZ, K.J.; SCHÜMMELFELDER, N.; MAURER, W.:
Dauer der DNS-Synthese-Phase bei Ascitestumoren der Maus unterschiedlicher Ploidie.
Naturwissenschaften 53 (1966) 21
56. LEVIS, A.G.; DANIELI, G.A.; PICCINNI, E.:
Nucleic acid synthesis and the mitotic cycle in mammalian cells treated with nitrogen mustard in culture.
Nature 207 (1965) 608 - 10
57. LISS, E.; PALME, G.:
Die Hemmung des Einbaues von P^{32} in die DNS durch Endoxan.
Naturwissenschaften 50 (1963) 336
58. LISS, E.; PALME, G.:
Der Einfluß von alkylierenden Zytostatika auf den Nukleinsäurestoffwechsel von EHRlich-Ascites-Tumorzellen.
Mitteilungsdienst GBK 4 (1964) 457 - 87
59. LISS, E.; PALME, G.:
Effects of cyclophosphamide on Ehrlich ascites cells.
Antimicrobial Agents Chemotherapy (1965) 493 - 96
60. MAK, S.; TILL, J.E.:
The effects of X-rays on the progress of L-cells through the cell cycle.
Radiation Res. 20 (1963) 600 - 18

61. MARUYAMA, Y.:
An isotopic method for determination of cell generation time.
Nature 168 (1963) 1181 - 83
62. MAURER, W.; KOBURG, E.:
Autoradiographische Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der DNS-Synthese bei den Epithelien des Darmes und bei anderen Zellarten der Maus.
Verhandl. Deut.Ges.Pathol. 45 (1961) 108 - 12
63. MAZIA, D.:
The life history of the cell.
Amer. Scientist 44 (1956) 1-32
64. MAZIA, D.:
Synthetic activities leading to mitosis.
J.Cellular Comp.Physiol.62 (Suppl.1) (1963) 123 - 40
65. MENDELSON, M.L.:
Chronic infusion of tritiated thymidine into mice with tumors.
Science 135 (1962) 213 - 15
66. MESSIER, M.; LEBLOND, C.P.:
Preparation of coated radioautographs by dipping sections in fluid emulsion.
Proc.Soc. Exptl. Biol.Med. 96 (1957) 7 - 10
67. MITTERMAYER, G.; BRAUN, R.; RUSCH, H.P.:
The effect of actinomycin D on the timing of mitosis in *Physarum polycephalum*.
Exp. Cell. Res. 38 (1965) 33 - 41
68. NISHIMURA, E.T.; BAUM, J.H.:
Effects of colchicine and *Serratia marcescens* polysaccharide on protoplasmic viscosity:
I. relationship of protoplasmic viscosity to cell division of EHRlich ascites tumor cells.
A.M.A. Arch. Path. 63 (1957) 352 - 66

69. OEHLERT, W.; LESCH, R.:
Autoradiographische Untersuchungen an menschlichen Geweben und Zellen
Deut.Med.Wochschr. 43 (1966) 1940 - 44
70. PALME, G.; LISS, E.; OEFF, K.; PLATIS, A.:
Der Einfluß von Cyclophosphamid auf die Desoxyribonucleinsäure-Synthese von normalen proliferierenden Zellen sowie Ascites-Tumorzellen. Autoradiographische und biochemische Untersuchungen.
Arzneimittelforsch. 13 (1963) 1034 - 39
71. PALME, G.; LISS, E.; WIEBEL, F.:
Autoradiographische Untersuchungen über das Verhalten einzelner Interphaseabschnitte des Dünndarmepithels der Maus unter der Einwirkung von Cyclophosphamid (Endoxan).
Naturwissenschaften 51 (1964) 197
- 71a. PALME, G.: Unveröffentlichte Untersuchungen (1965)
72. PALME, G.; MERKER, H.J.; LISS, E.:
Autoradiographic and electronmicroscopic studies on Ehrlich carcinoma cells after treatment with alkylating agents.
Abstr.9.Intern.Cancer Congress, Tokyo (1966) 344
73. PALME, G.; MALONEY, E.A.:
Kinetics of neutrophil balance.
In: F.Stohlgman (ed.), The kinetics of cellular proliferation. New York: Grune & Stratton, Inc., (1959) 201 - 7
74. PEIC, S.R.:
Autoradiographic technique.
Nature 160 (1947) 749 - 50
75. PILGRIM, C.; MAURER, W.:
Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdopplungszeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei Doppelmarkierung mit H^3 - und C^{14} -Thymidin
Naturwissenschaften 49 (1962) 544 - 45

76. PIRWITZ, J.; SCHWAB, B.; SEYFARTH, K.A.:
Das Ehrlich-Ascites-Carcinom der Maus als
Testobjekt cytostatischer Substanzen.
Mikroskopie 3 Sonderband (1949) 29 - 42
77. POHLE, K.; MENG, K.; MATTHIES, E.:
Die 24 h- Mitoserhythmiik beim S₂-Ascites-Sarkom
und beim Ehrlich-Ascites-Carcinom der weißen
Maus.
Z. Krebsforsch. 64 (1961) 208 - 14
78. POTTER, V.R.:
Metabolic productes formed from thymidine.
In: F.Stohlman (ed.), The kinetics of cellular
proliferation.
New York: Grune & Stratton, Inc., (1959) 104 - 13
79. PRESCOTT, D.M.:
Nucleic acid and protein metabolism in the
macronuclei of two ciliated protozoa.
J.Histochem.Cytochem. 10 (1962) 145 - 53
80. PÜTTER, J.:
Über die biochemischen Wirkungen von Cytostati-
ca auf Tumorzellen.
In: Therapie maligner Tumoren. Hämoblastome und
Hämoblastosen.
Bd.I, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1961)
80 - 146
81. QUASTLER, H.; SHERMAN, F.G.:
Cell population kinetics in the intestinal
epithelium of the mouse.
Exp. Cell Res. 17 (1959) 420 - 38
82. QUASTLER, H.:
The analysis of cell population kinetics.
In: L.F. Lamerton and R.J.M.Fry (ed.), Cell
proliferation Oxford: Blackwell Scientific Publi-
cation, (1963) 18 - 34

83. REICHARD, P.; ESTBORN, B.:
Utilization of desoxyribosides in the synthesis
of polynucleotides.
J. Biol.Chem., 188 (1951) 839 - 46
84. RÉVÉSZ, L.; FORSBERG, A.; KLEIN, G.:
Quantitative studies on the multiplication of
neoplastic cells in vivo. III. Metabolic stabi-
lity of deoxypentose nucleic acid and the use
of labeled tumor cells for the measurement of
growth curves.
J.Nat.Cancer Inst. 17 (1956) 37 - 47
85. ROSS, W.C.J.:
In vitro reaction of biological alkylating agents
Ann. N.Y. Acad. Sci., 68 (1958) 669 - 81
86. ROSS, W.C.J.:
Biological alkylating agents
London: Butterworths (1962)
87. RUTHAN, R.J.; STABLES, W.J.; PRICE, C.C.:
Observation on the in vivo alkylation of Ehrlich
Tumor cell DNA by nitrogen mustards.
Biochem. Biophys.Res.Comm. 4 (1961) 278 - 82
88. SATO, H.; BELKIN, M.; ESSNER, E.:
Effect of nitrovin on mitosis and cytoplasmic
volume in the cells of two mouse ascites tumors.
J.Nat.Cancer Inst. 17 (1956) 421 - 34
89. SCHMEISER, K.:
Radioaktive Isotope. Ihre Herstellung und An-
wendung.
Springer Verlag Berlin - Göttingen - Heidelberg
(1957)
90. SCHULTZE, B.; OEHLERT, W.; MAURER, W.:
Vergleichende autoradiographische Untersuchung
mit H^3 -, C^{14} - und S^{35} -markierten Aminosäuren zur
Größe des Eiweißstoffwechsels einzelner Gewebe
und Zellarten der Maus, Ratte und Kaninchen.
Beitr.Pathol.Anat.Allgem.Pathol. 122 (1960)
406 - 31.

91. SEGER, P.G.:
Untersuchungen am Tumor-Ascites der Maus.
I.Mitteilung: Vitalfärbbarkeit der Ascites-
zellen.
Arch. Exp. Zellforsch. 22 (1937) 280 - 335
92. SHERMAN, F.G.; Quastler, H.; WIMBER, D.R.:
Cell population kinetics in the ear epidermis
of mice.
Exp.Cell Res. 25 (1961) 114 - 19
93. SMELLIE, R.M.S.; McARDLE, A.H.; KEIR, H.M.; DAVIDSON, J.N.:
The incorporation of (4-³H) thymidine and
(8-¹⁴C) adenine into DNA by particle-free
extracts of mammalian cells.
Biochem. J. 69 (1958) 37 P.
94. STARKEY, W.E.:
The migration and renewal of tritium labelled
cells in the developing enamel organ of rabbits.
J.Brit.Dental Assoc. 115 (1963) 143 - 63.
95. SWANN, M.M.:
The control of cell division: A review,
I.General mechanisms. Cancer Res. 17 (1957)
727 - 57
96. ——— The control of cell division: A review,
II. Special mechanisms. Ibid. 18 (1958) 1118 - 60
97. TAYLOR, J.H.:
Nucleic acid synthesis in relation to the cell
division cycle.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 90 (1960) 409 - 21
98. VAN'T HOF, J.; YING, H.:
Simultaneous marking of cells in two different
segments of the mitotic cycle.
Nature 202 (1964) 981 - 83

99. WATANABE, I.; OKADA, S.:
Study of mechanisms of radiation-induced re-productive death of mammalian cells in culture: Estimation of stage at cell death and biological description of processes leading to cell death.
Radiation Res. 27 (1966) 290 - 306
100. WHEELER, G.P.:
Studies related to the mechanisms of action of cytotoxic alkylating agents:
A review. Cancer Res. 22 (1962) 651 - 88
101. WIMBER, D.E.; QUASTLER, H.:
A C^{14} - and H^3 -thymidine double labeling technique in the study of cell proliferation in Tradescantia root tips.
Exp. Cell Res., 30 (1963) 8 - 22
102. YAMADA, M.; PUCK, T.T.:
Action of radiation on mammalian cells.
IV. Reversible mitotic lag in the S3 HeLa cell produced by low doses of X-rays.
Proc.Natl.Acad, Sci. U.S. 47 (1961) 1181 - 91
103. ZAJICEK, G.; BERNSTEIN, N.; GROSS, J.;
Studies on the vitro incorporation of tritiated thymidine into ascites tumor cells.
Exp. Cell. Res. 31 (1963) 390 - 96
104. ZEUTHEN, E.:
Tetrahymena cells in the G_2 -Phase - Sensitivity to temperature and to inhibitors of protein synthesis.
J. Cellular Comp. Physiol. 62 Suppl. 1 (1963) 148 - 49

Für die Überlassung des Themas und die Förderung der Arbeit bin ich Herrn Professor Dr.med. Karl Oeff zu großem Dank verpflichtet. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. G. Palme für die wertvollen Anregungen und Ratschläge zur Durchführung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich alle den Mitarbeitern der Nuklearmedizinischen Abteilung, die mir jederzeit freundliche Unterstützung und Hilfe gewährten, besonders Fräulein Sigrid Schiller, sehr herzlich danken.

L E B E N S L A U F

=====

Am 5. Februar 1938 wurde ich als zweiter Sohn des Dr.med. habil. Heinrich Wiebel und seiner Ehefrau Dr.med. Adelheid Wiebel, geb. Kriele in Marburg/Lahn geboren. Ich besuchte die dortige Volksschule 2 Jahre. 1947 siedelte die Familie nach Gütersloh / Westfalen um. Dort bestand ich nach 2 weiteren Volksschuljahren die Aufnahmeprüfung des Ev.Stift. Gymnasiums, dessen humanistischen Zweig ich wählte.

Nach dem Abitur 1957 nahm ich das Studium auf, das sich in folgende Abschnitte gliederte:

- 1957 - 1958 Univ.Heidelberg: Studium der Theologie, Hebraicum.
- 1958 - 1959 Univ.Göttingen : Fortsetzung des Theologie-Studiums
im 4.Semester Beginn des Medizinstudiums.
- 1959 - 1961 Univ.Tübingen : Vorphysikum, Physikum und
1.klin. Semester.
- 1961 - 1962 Univ.Wien : 2.klin. Semester
- 1962 - 1965 Freie Univ. Berlin: Klin.Studium bis zum Staats-
examen im März 1965.

Im April 1965 heiratete ich die Krankengymnastin Irmhild Engelbrecht. Von Mai 1965 war ich als Medizinalassistent in Berlin tätig, und zwar von Mai bis Oktober 1965 in der I.Med. Klinik der Freien Universität, von November 1965 bis Januar 1966 im Deutschen Rote Kreuz-Krankenhaus, Drontheimer Str., Chirurgische Abt., von Februar bis Mai 1966 in der Frauenklinik und Säuglings-Heim Haus Dahlem, im Juni im Städt.Kinderkrankenhaus, Berlin-Wedding, Chirurg.Abtl.

Zuletzt arbeitete ich in der Nuklearmedizinischen Abteilung der Med.Kliniken der Freien Universität Berlin.

